

TARTU ÜLIKOOL
LOODUS- JA TÄPPISTEADUSTE VALDKOND
MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT

**Inimese endomeetriumi stroomarakkude rakutsükli faasist-sõltuv detsidualiseerumise
dünaamika**

Bakalaureusetöö

12 EAP

Karoliina Kangur

Juhendajad Dr. Kersti Jääger, PhD

Dr. Tambet Tõnissoo, PhD

TARTU 2020

Inimese endomeetriumi stroomarakkude rakutsükli faasist-sõltuv detsidualiseerumise dünaamika

Märksõnad: endomeetrium, detsidualiseerumine, rakutsükkel

B450 Arengubioloogia, teratoloogia, ontogenees, (inim)embrüoloogia

Inimese endomeetriumi stroomarakud (hEnS rakud) teevad naise menstruaaltsükli jooksul läbi morfoloogilise ja funktsionaalse muutuse, mida nimetatakse detsidualiseerumiseks. Hormoonide cAMP (tsükline adenosiinmonofosfaat) ja MPA (medroksüprogesteron-atsetaat) koosmõjul asuvad hEnS rakud diferentseeruma, moodustades areneva embrüo pesastumiseks vajaliku keskkonna. Pesastumise ajastamine on oluline edukaks raseduseks. Kuna hEnS rakud on pidevas tsüklikes muutumises ja läbivad nii aktiivse jagunemise kui ka diferentseerumise faase, siis tõstatasime küsimuse, kas hEnS rakkude vastus detsidualiseerumise signaalidele võiks sõltuda nende rakutsükli staadiumist. Rakutsükli G1 faasis on rakud tüüpiliselt vastuvõtlikumad kasvukeskkonnast tulevatele signaalidele, suunates neid diferentseeruma. Antud töö tulemused lubavad püstitada tulevaseks uuringuks hüpoteesi, mille järgi indiviidide vahelised erinevused detsidualiseerumise dünaamikas tulenevad geeniekspressiooni varieeruvusest eelkõige S/G2 faasis. Samuti näitasime uurimustööga, et primaarseid hEnS rakke on võimalik läbivoolutsütomeetrial G1 ja S/G2 rakutsükli faaside suhtes rikastada, kasutades DNA-värvi DRAQ5.

Cell cycle-modulation of decidualization dynamics of human endometrial stromal cells

Keywords: endometrium, decidualization, cell cycle

B450 Development biology, teratology, ontogeny, embryology (human)

Human endometrial stromal cells (hEnS cells) undergo dramatic morphological and functional cell differentiation during woman's menstrual cycle. Differentiation of hEnS cells upon treatment with hormones cAMP (cyclic adenosine monophosphate) and MPA (medroxyprogesterone acetate) is called decidualization. This process prepares the uterus for implantation of the developing embryo. Timing of the embryo implantation is relevant for establishing successful pregnancy. Since hEnS cells are on constant cyclic development and go through active proliferative and differentiation phases, we raised a question whether hEnS cells' response to decidualization signals could depend on the stadium of the cell cycle. Typically, hEnS cells are more sensitive to differentiation signals from growth environment when positioned in G1 phase. Therefore, this study's results hypothesize that the differences between individuals in decidualization dynamics comes from the gene expression variability primarily in S/G2 phase of the cell cycle. In addition, this study demonstrates that primary hEnS cells can be enriched for G1 and S/G2 phases with DNA stain DRAQ5 using flow cytometry.

SISUKORD

INFOLEHT	2
SISUKORD	3
KASUTATUD LÜHENDID	4
SISSEJUHATUS	5
1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE	6
1.1. Endomeetriumi retseptiivsus	6
1.2. Inimese endomeetriumi detsidualiseerumine	7
1.3. Detsidualiseerimine raku tasandil	8
1.3.1. Detsidualiseerimismarkerid	9
1.4. Rakutsükli roll detsidualiseerumisel	12
2. EKSPERIMENTAALOSA	14
2.1. Töö eesmärgid	14
2.2. Materjal ja metoodika	14
2.2.1. Rakkude kasvatamine koekultuuris	14
2.2.2. Läbivoolutsütomeetria	14
2.2.3. Detsidualiseerimine <i>in vitro</i>	15
2.2.4. Valgusmikroskoopia	15
2.2.5. RNA eraldamine, cDNA süntees ja kvantitatiivne PCR	16
2.2.6. Statistiline analüüs	18
2.3. Tulemused ja arutelu	19
2.3.1. Rakkude rikastamine G1 ja S/G2 faasi suhte	19
2.3.2. hEnS rakkude rikastamine DNA-värviga on võimalik rakutsükli G1 ja S/G2 faasi	20
2.3.3. Detsidualiseerimise <i>in vitro</i> toimumise kindlaks tegemine detsidualiseerimismarkerite abil	21
2.3.4. hEnS rakkude tundlikkus hormoonidele erineb indiviiditi S/G2 faasis	22
KOKKUVÕTE	25
SUMMARY	26
TÄNUSÕNAD	27
KIRJANDUSE LOETELU	28
KASUTATUD VEEBIAADRESSID	32
LIHTLITSENTS	33

KASUTATUD LÜHENDID

cAMP	tsükliline adenosiinmonofosfaat (ingl k <i>cyclic adenosine monophosphate</i>)
cDNA	komplementaarne DNA (ingl k <i>complementary DNA</i>)
CS-FBS	süsiga puhastatud veise loote seerum (ingl k <i>charcoal-stripped fetal bovine serum</i>)
DMEM/F-12	(ingl k <i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium F-12</i>)
FACS	fluorestsents-aktiveeritud rakkude sorteerimine (ingl k <i>fluorescence-activated cell sorting</i>)
FBS	veise loote seerum (ingl k <i>fetal bovine serum</i>)
MPA	medroksüprogesteroon-atsetaat ehk sünteetiline progestiin (ingl k <i>medroxyprogesterone acetate</i>)
PBS	fosfaat-puhverdatud soolalahus (ingl k <i>phosphate-buffered saline</i>)
qRT-PCR	kvantitatiivne reaalaja polümeraasi ahelreaktsioon (ingl k <i>quantitative-reverse transcription-polymerase chain reaction</i>)

SISSEJUHATUS

Inimese emaka limaskest ehk endomeetrium teeb tsükliliselt naissuguhormoonide juuresolekul läbi ulatusliku morfoloogilise ja funktsionaalse remodelleerumisprotsessi tagamaks potentsiaalsele embrüole sobilikku keskkonda kinnitumiseks ehk implantatsiooniks. Sellist viljastumisjärgset endomeetriumi ümberkujundamise protsessi nimetatakse detsidualiseerumiseks. Areneva embrüo ehk blastotsüsti ajastatud pesastumine tagab terve ja püsiva raseduse. Inimese detsidualiseerumise mehhanismide uurimine on mõistetavatel põhjustel piiratud, seetõttu pärinevad teadmised peamiselt katsetest inimese rakuliinidega. Antud bakalaureusetöös kasutati inimese primaarseid endomeetriumi stroomarakke (hEnS rakud), et uurida detsidualiseerumisprotsessi dünaamikat. Kuna rakud muutuvad regulaarselt detsidualiseerumise käigus, tõstasime küsimuse, kas hEnS rakkude reageerimine detsidualiseerumise signaalidele võiks sõltuda nende rakutsükli faasist. Üldjuhul on rakud ümbritsevast keskkonnast tulenevatele diferentseerumisele suunavatele signaalidele vastuvõtlikumad rakutsükli G1 faasis. Mõistes endomeetriumis toimuvaid protsesse on võimalik paremini ravida naistel viljatust ning hoiduda korduvatest nurisünnitustest, mis on peamised detsidualiseerumisprotsessi häirete tagajärjed.

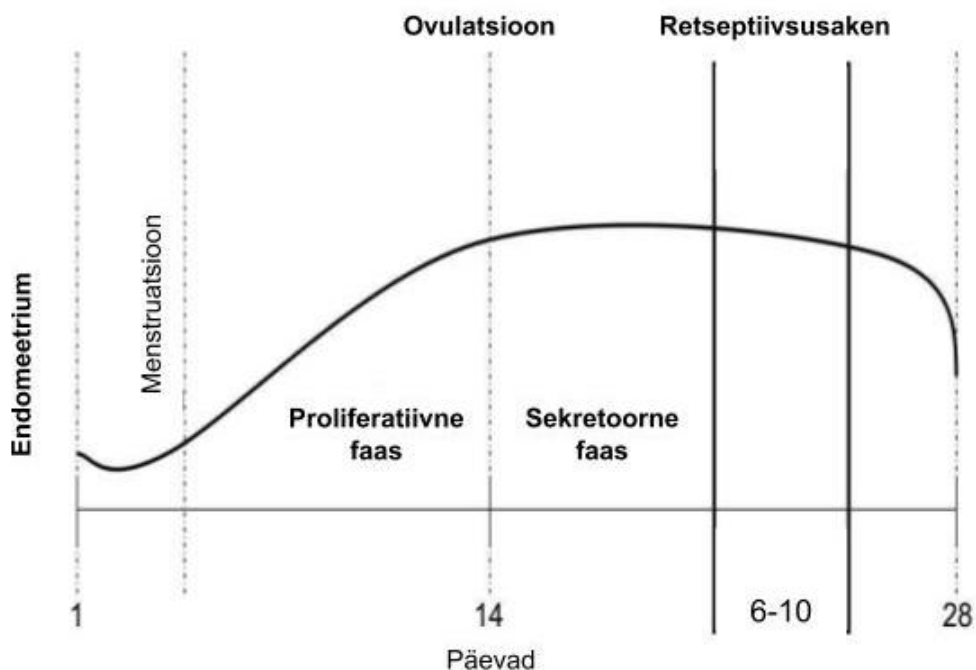
Bakalureusetöö teoreetilises osas antakse ülevaade endomeetriumi tsükli olemusest, rakkude detsidualiseerumisest ja rakutsükli rollist selles protsessis. Lisaks kätkeb kirjanduse ülevaade selle teema olulisust ja kajastumist teadusmaastikul. Eksperimentaalse osa põhieesmärk oli välja selgitada endomeetriumi detsidualiseerumisprotsessi dünaamika sõltuvus rakutsükli faasist. Töö koosnes kahest etapist. Esiteks sorditi hEnS rakud DNA-värviga läbivoolutsütomeetri abil rakutsükli G1 ja S/G2 faasi ning teiseks uuriti rakutsükli eri faasides detsidualiseerunud hEnS rakkudest kogutud RNA muutusi suhtelise geeniekspressiooni analüüsi põhjal. Töö eksperimentaalne osa viidi läbi Tervisetehnoloogiarenduskeskuses.

1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

1.1. Endomeetriumi retseptiivsus

Inimese emakas koosneb kolmest histoloogilisest kihist: endomeetrium (limaskest), müomeetrium (lihaskest) ja perimeetrium (serooskest) (Miftahof ja Nam, 2011). Endomeetriumi moodustavad emaka sisepinda vooderdavad epiteeli- ja stroomarakud (Okada jt., 2018). Endomeetriumi põhifunktsioon on tekitada lõigustunud embrüo ehk blastotsüsti kinnitumiseks emakasse ehk implantatsiooniks sobiv keskkond ning toetada edasist loote arengut (Miftahof ja Nam, 2011).

Naise endomeetrium läbib unikaalse perioodiliselt korduva muutuse, mis võimaldab blastotsüstil kinnituda. Endomeetriumi tsükel koosneb follikulaarsest ehk proliferatiivsest faasist, mis järgneb menstruatsioonile ja eelneb ovulatsioonile, ning luteaalsest ehk sekretoorsest faasist, mis kujuneb peale ovulatsiooni (Joonis 1). Menstruaaltsükli kesk-sekretoorse faasi endomeetriumi stroomarakkude (hEnS rakkude) morfoloogilist ja funktsionaalset muutust nimetatakse detsidualiseerumiseks. Detsidualiseerunud hEnS rakud tekitavad endomeetriumis mikrokeskkonna, mis on vajalik blastotsüsti pesastumiseks. (Okada jt., 2018)



Joonis 1. Endomeetriumi tsükel. Joonis on modifitseeritud Hawkins ja Matzuk (2010) artiklist.

Endomeetriumi võimet soodustada embrüo pesastumist nimetatakse retseptiivsuseks. Endomeetriumi retseptiivsuse kujunemine on normaalse raseduse eelduseks. Retseptiivsusega seonduvad probleemid võivad viia hääreteni implantatsioonis, mis omakorda on seotud viljatusega ja kõrge nurisünnituse riskiga. (Lessey ja Young, 2019) Implantatsiooni ebaõnnestumise põhjustab $\frac{2}{3}$ juhtudest ebasobiv endomeetriumi retseptiivsus, $\frac{1}{3}$ ebaõnnestumisest moodustab embrüo ise. Endomeetriumi retseptiivsus on nagu pudelikael rasedusele. Uuringud emaka implantatsiooni ettevalmistamisel aitaks välja töötada efektiivsema ravi naise viljatuse vastu. (Achache ja Revel, 2006)

Emaka limaskest on unikaalne selle poolest, et ta suudab blokeerida blastotsüsti kinnitumist ning lubab selle kinnitumist ainult lühikese retseptiivsusakna ehk implantatsiooniakna jooksul. (Lessey ja Young, 2019). On välja selgitatud, et implantatsioon toimub normaalse menstruaaltsükli 20. kuni 24. päeval. Strooma fibroblastid muutuvad sekretoorseteks detsiduaalrakkudeks iga menstruaaltsükli kesk-sekretoorse faasi ajal olenemata raseduse tekkimisest (Teklenburg jt., 2010).

Embrüonaalse koe (trofektodermi päritolu rakkude) ja emaka rakkude (detsidua) vaheline funktsionaalne interaktsioon on seotud steroidhormoonide, kasvufaktorite ja tsütokiinidega. Endomeetriumi morfoloogilise ja funktsionaalse seisundi valmistavad ette munasarjade steroidhormoonid. (Singh jt., 2011)

Achache ja Revel (2006) artikli põhjal on enamus implantatsiooni alased uuringud tehtud loomadega, kuid loomudelitest tihti ei piisa mõistmaks inimeses aset leidvaid protsesse. Järjest rohkem soovitatakse pöörata fookus pigem emaka endomeetriumi funktsionaalsuse uurimisse ja vähem morfoloogial põhinevatesse uuringutesse. (Achache ja Revel, 2006)

1.2. Inimese endomeetriumi detsidualiseerumine

Detsidualiseerumine algab endomeetriumis steroidihormoonide mõjutusel ligikaudu kuus päeva peale normaalset ovulatsiooni, mida iseloomustab rakkude proliferatsioon (Irwin jt., 1989).

Detsidualiseerumine, blastotsüsti implantatsioon ja platsenta areng - need raseduse protsessid endomeetriumis on kõik kontrollitud steroidhormoonide östradiooli ja progesterooniga. Need jagavad signaale embrüo ja endomeetriumi vahel, et detsidualiseerumine, blastotsüsti pesastumine ja platsenta areng saaksid järjest etapiliselt toimuda (Okada jt., 2018). Östradiool ja progesteroon mõlemad käituvad endomeetriumis regulaatoritena. hEnS rakkudele on loomuomane detsidualiseeruda ning selle protsessi algatab progesterooni taseme tõus. Samal ajal

surub progesteroon alla hEnS rakkude proliferatsiooni. Hormoon kontrollib endomeetriumi sekretoorses faasis. (Knobil, 2014) Progesterooni ebapiisav tase on seotud viljatuse ja nurisünnitusega. (Okada jt., 2018)

Kui viljastumist ei toimu, siis endomeetriumi detsiduaalkiht irdub ja laguneb. Peale seda hakkab endomeetrium valmistuma uueks tsükliks ja tulevaseks ovulatsiooniks. Sellise plastilisuse taga on samuti naissuguhormoonid östradiool ja progesteroon. (Knobil, 2014)

Inimese detsidualiseerimise mehhanismide uurimine on piiratud eetilistel põhjustel, seetõttu on uuringud tehtud peamiselt erinevate rakuliinidega (Samalecos jt., 2009). Üheks võimaluseks selgitamiseks endomeetriumi tundlikkust detsidualisatsioonil *in vitro* tingimustes on kasutada uuringuteks hEnS rakke.

Irwin jt. (1989) lõi *in vitro* mudelsüsteemi endomeetriumis toimuva detsidualiseerumisele, kus hEnS rakud reageerivad steroidihormoonidele, tekitades rakkudes ehituslikke, proliferatiivseid ja biokeemilisi muutusi. Stroomarakkude sünteetilise progestiini (sünteetiline progesteroon) ja östradiooliga indutseerimine mõjutas rakkude kasvu kuni kolm korda rohkem. Steroidihormoonide mõjutus kutsub rakkudel esile mitootilise aktiivsuse. (Irwin jt., 1989)

Kasutades cAMP, östradiooli ja progesterooni analooge on võimalik matkida ovulatsiooni järgset *in vivo* keskkonda, tekitades kunstlikult hEnS rakkude detsidualiseerumise. Progesterooni hormoon takistab rakkude jagunemise a ja suunab rakud diferentseeruma. *In vitro* uuringud on näidanud (Knobil, 2014), et progesterooniga mõjutades detsidualiseeruvad rakud 12. päeval, kuid cAMP-ga mõjutades juba vähem kui kolme päevaga. Neid hormoone koos kasutades, nagu Saleh jt (2011) leidis oma uuringus, on võimalik detsidualisatsiooni saavutada lühema ajaga. cAMP ja progesterooni analoogidega (8-br-cAMP ja MPA) koos mõjutades on võimalik tekitada detsidualisatsioonile *in vivo* sarnane keskkond *in vitro* juba 1-3 päevaga, mida kinnitavad (Labied jt., 2006; Ganefft jt., 2008) uurimustööde protokollid.

1.3. Detsidualiseerimine raku tasandil

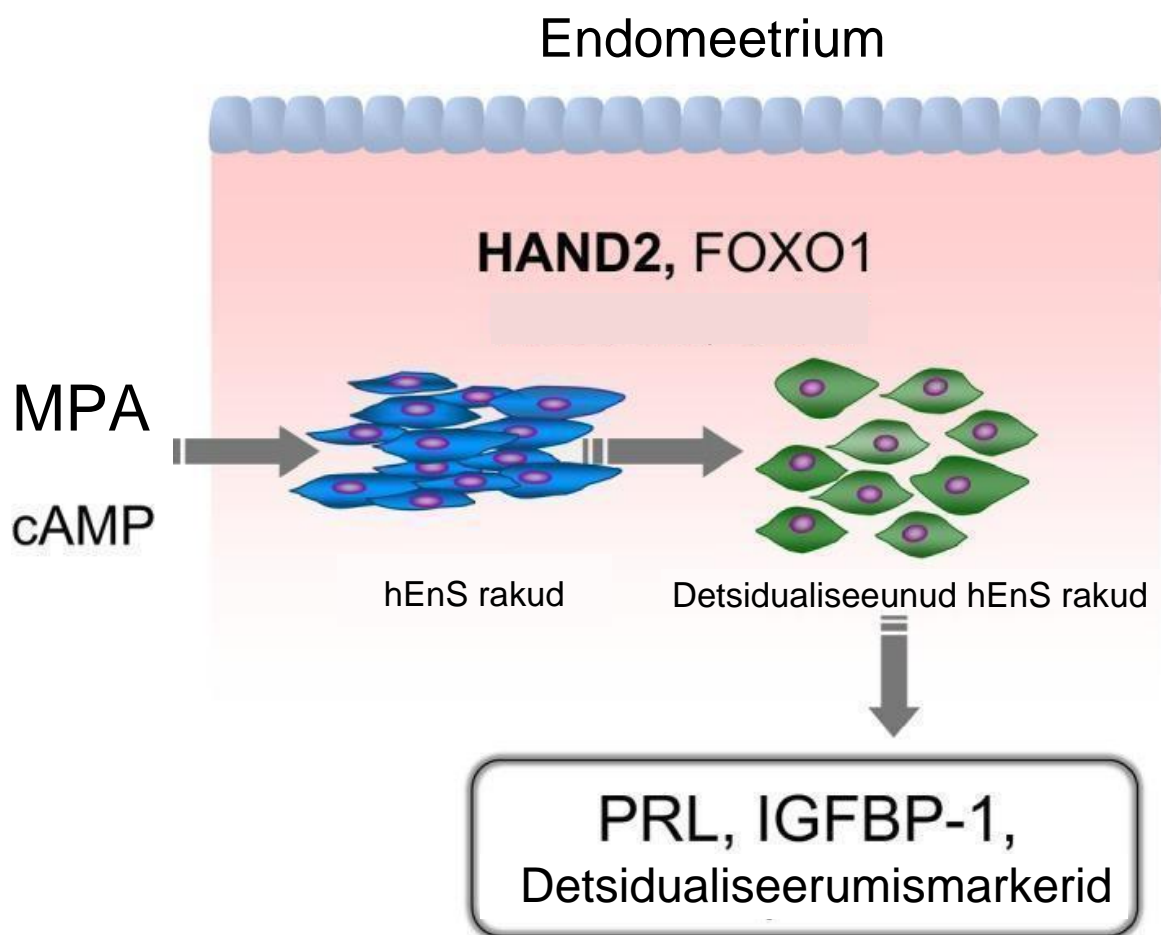
Detsidualiseerunud hEnS rakud omavad normaalseks blastotsüsti implantatsiooni erilisi biokeemilisi ja rakulisi omadusi. Piklikud fibroblasti sarnased mesenhümaalsed rakud muutuvad naissuguhormoonide mõjutusel suuremateks polügonaalseteks, epiteelilaadseteks rakkudeks. Endomeetriumi ümberkujundamisega muutuvad proliferatiivsed hEnS rakud sekretoorseteks. Detsidualiseeritud hEnS rakud määravad endomeetriumi mikrokeskkonna ning mõjutavad

otseselt või kaudselt ekstratsellulaarse maatriksi (ingl k *extracellular matrix*, ECM) modelleerimist (Singh jt., 2011). Samuti moodustatakse suurte granuleeritud lümfotsüütide emakaspetsiifiliste loomulike tapjarakkude (NK) rakkude populatsioon koos T-rakkude ja makrofaagidega. Lisaks toimub emaka veresoonte ümberkujundamise protsess, mille käigus tekitatakse nn spiraalsed arterid (Strowitzki jt., 2006).

Rakkude diferentseerumist reguleerivad erinevad hormoonid, kasvufaktorid ja tsütokiinid. Uuringute põhjal arvati (Kim jt., 1998), et cAMP stimuleerimise signaalrada on oluline detsidualiseerumisele. Selle signaalraja käivitamine mõjutab paljude geenide, nagu *IGFBP-1* ja *PRL*, transkriptsiooni. Arvatakse, et *IGFBP-1* on seotud IGF valkudega, mis on tuntud mitootilise ja diferentseerumise stimulaatoritena hiirtega tehtud katsetes (Singh jt., 2011; Strowitzki jt., 2006). cAMP ja MPA signaalradade aktiveerimine indutseerib detsidualiseerumisele samuti vajalike *FOXO* geenide ekspressiooni, kus aktiveeritud FOXO valgud indutseerivad geene, mis on seotud rakutsükli pärssimist kodeerivate valkudega (Labied jt., 2006).

1.3.1. Detsidualiseerimismarkerid

Detsidualiseerunud hEnS rakud hakkavad hormoonide mõjutades ekspresseerima geene, mis on vajalikud detsidualiseerumise jaoks (Joonis 2). Markergeenide mRNA abil on võimalik mõõta kvantitatiivsel reaalaaja polümeraasi ahelreaktsioonil (qRT-PCR) ekspresseerumistaset, et analüüsida hEnS rakkude tundlikkust hormonaalsele mõjutusele.



Joonis 2. Hormoonide mõjul hEnS rakkude detsidualiseerumine ning sellega indutseeruvad geenid. MPA koos cAMP-ga indutseerivad *HAND2* ja *FOXO1* transkriptsioonifaktoreid, mis reguleerivad detsidualiseerumise geenivõrgustikku. Aktiveeritakse geenide *PRL* ja *IGFBP-1* ekspressioon. Joonis on modifitseeritud Okada jt. (2018) artiklist.

Detsidualiseeritud stroomarakkude peamised sekretoorsed produktid on valgud PRL ja IGFBP-1, mida loetakse tuntuimateks detsidualiseerimismarkeriteks (Okada jt., 2018). IGFBP-1 mängib olulist rolli endomeetriumi füsioloogias ja patoloogias (Fowler jt., 2000). IGFBP-1 on emakasisese epiteelkoe valk, mida ei ekspresseeri detsidualiseerimata stroomarakud. *IGFBP-1* mRNA-d ekspresseerivate rakkude vahel esineb suur heterogeensus, mis sõltub strooma fibroblastide rakutsüklist. (Julkunen jt., 1990). *IGFBP-1* mRNA-d on varasemate uuringute põhjal leitud naise endomeetriumi hilise sekretoorse faasi eel-detsidualiseerunud stroomarakkudes ning rasestunud naise endomeetriumi detsidualiseerunud rakkudes. (Matsumoto jt., 2008) Progesteron stimuleerib detsidualisatsiooni, mõjutades *IGFBP-1* taseme tõusu. (Gellersen ja Brosens, 2014) Ganef jt. (2008) katse *IGFBP-1* markeriga *in vitro* detsidualiseerumisel näitab cAMP ja MPA-ga indutseerimise maksimumi hEnS rakkudel juba kolmandal päeval.

Prolaktiin (PRL) kuulub kasvuhormoonide perekonda. Endomeetriumis stimuleerib PRL taset samuti progesteroon. Endomeetrium toodab prolaktiini laadseid molekule, mis suudavad endaga siduda prolaktiin-R (PRL-R). (Freeman jt., 2000). *PRL*-i ekspresseeritakse raseduse või pseudoraseduse esimesel nädalal ning see hoiab progesterooni taseme normaalsena. *PRL* võib ise stimuleerida oma retseptori ekspressiooni. (Knobil, 2014) Progesteroon algatab *PRL* sünteesi ja tootmist, kuid progesterooni retseptoritega uuring on näidanud, et see ei indutseeri otseselt *PRL* ekspressiooni. Loomkatsed on näidanud, et *PRL* ekspressiooni puudus endomeetriumis on seotud reproduktiivprobleemidega, mis viib embrüo implantatsiooni ebaõnnestumiseni. (Garzia jt., 2004) Blastotsüsti implantatsioonile, raseduse kestvusele ja ovulatsiooni pärssimisele on määrav progesterooni produktsioon ja selle regulatsioon. Progesterooni tootmist munasarja kollaskeha luteaalsete rakkude poolt stimuleerib *PRL*-i lutetroopne toime. Lisaks, on *PRL* suuteline pidurdama epiteelirakkude degeneratsiooni ja lagunemist (Bole-Feysot jt., 1998). cAMP ja MPA-ga mõjutades on võimalik *PRL* tase, mis on omane detsidualiseerimisele saavutada *in vitro* juba kahe päevaga (Ganefft jt., 2008).

PRL-ga on tihedalt seotud ka prolaktiini retseptor (*PRL-R*). *PRL-R* leidub peamiselt epiteelirakkudes ning selle ekspressiooni maksimum on sekretoorse faasi keskel ja lõpus (Gellersen ja Brosens, 2014). Emaste hiirtega tehtud uuringutes on näidatud, et *PRL-R*-ta esineb viljatust, häireid ovulatsioonis, ootsüütide küpsemise vähenemine ning ei esine blastotsüsti implantatsiooni. (Bole-Feysot jt., 1998), seega *PRL-R* KO hiired ei ole võimelised tiinestuma ja tulemuseks on viljatus.

Paljud detsidualiseerimismarkerid ekspresseeritakse nii endomeetriumi stroomarakkudes hilise sekretoorse faasi ajal kui ka epiteelirakkudes proliferatiivse faasi ajal. Selliselt käitub transkriptsiooniline detsidualiseerumismarker *FOXO1*. (Gellersen ja Brosens, 2014) *FOXO1* kontrollib raku differentseerumisega ja rakutsükli regulatsiooniga (nt G2/M faasi üleminekuks vajaliku *CCNB1* geeni ekspressiooni) seotud geenide ekspressioonil. Lisaks on *FOXO1* oluline roll raku saatuse otsustamisel. Takano jt. (2007) uuringust selgub, et *FOXO1* koordineerib detsidualisatsioonil raku proliferatsiooni ja differentseerumist ning kaitset keskkonnast tuleneva ja oksüdatiivse stressi vastu. *FOXO1* reguleerib ka põhiliste detsiduaalrakkude sekretoorsete markerite, nagu *IGFBP-1* ja *PRL*, ekspressioone. (Takano jt., 2007)

HAND2 on transkriptsioonifaktor, mis on vajalik lõpuskaarte, jäsemepungade ja südame arenguks ning kasvuks. *HAND2* mängib olulist rolli ka emaka retseptiivsuses. On näidatud, et hEnS rakkude detsidualisatsioonil tõstab progesteroon *HAND2* mRNA taset. *In vitro*

detsidualiseerumisele vastava *HAND2* mRNA ekspresseerumistaseme saavutamiseks piisab rakkude mõjutamisest cAMP ja MPA-ga 1-3 päeva. (Cho jt., 2013)

1.4. Rakutsükli roll detsidualiseerumisel

Emaka dünaamiline füsioloogia on tihedalt seotud erinevate rakutsükli ehk rakkude jagunemist reguleerivate faktoritega. Üldiselt on inimese rakud G0 ehk puhkefaasis, kus nad on metaboolselt aktiivsed, kuid ei jagune. Rakud vajavad kasvufaktori signaali, et käivitada rakutsükkel ja liikuda edasi G1 faasi. S faasis sünteesitakse DNA ja tekib kaks tütarchromatiidi. G2 faasis valmistutakse ette M faasi tütarakkudeks jagunemiseks. Mitoosi käivitab tsükliin B, mis saab signaali kinaasilt CDK1.

Rakutsükkel on kontrollitud G1/S ja G2/M üleminekufaasides. Organismil kestab rakutsükli G2 ja M faas võrreldes G1 ja S faasiga palju vähem aega (4 tundi rakutsükli 14-16 tunnisest koguaegast). Varasem uuring inimese rakuliini *HeLa*-ga näitas, et ligi pool perioodiliselt ekspresseeritud geenidest saavutasid maksimumi rakutsükli G2 ja M faasis. (Whitfield jt., 2002)

G1 faasis on D-tüüpi tsükliinid raku proliferatsiooni peamised regulaatorid. D-tüüpi tsükliinid ehk G1 tsükliinid kogunevad rakutsükli G1 faasis, kus nad on ühenduses tsükliinsõltuvate kinaaside CDK4 või CDK6-ga, mis aitavad raku edasi S faasi. D-tüüpi tsükliinide üleekspresseerimine teeb G1 faasi lühemaks ja tagab raku kiire S faasi ülemineku. A- ja B-tsükliinid on rakutsükli S ja G2/M faasi üleminekul. G-tüüpi tsükliinid on rakutsükli inhibiitorid. Nii positiivne kui ka negatiivne rakutsükli regulatsioon on määrav raku jagunemise otsusele. (Das, 2009)

Rakutsükli rolli raku seisundi muutumises on kõige rohkem uuritud embrüonaalsetes tüvirakkudes. Singh jt. (2013) uurimistööga seletatakse embrüonaalsete tüvirakkude dünaamikat transkriptsiooniliste regulaatorite heterogeense ekspressiooniga. G1 faasi hEnS rakud on lühikest aega võimelised reageerima nende muutumist käivitavatele signaalidele, mis aktiveerivad arengu ja kasvamisega seotud geenid. Veel ei mõisteta, miks ja kuidas G1 faasi ajal tekkiv signaalidele reageeriv ajutine aken aktiveerib geenide transkriptsiooni efektiivsemalt. Singh jt (2013) uuringus leiti, et G1 faasi rakud võrreldes teiste faasidega on palju tundlikumad signaalidele, mis suunavad neid muutuma. Uuringu tulemused näitasid, et rakud eelistavad diferentseeruda rakutsükli G1 faasis.

Rakutsükliit reguleerivad faktorid on kriitilise tähtsusega emaka rakkude proliferatsioonil, detsidualisatsioonil ja implantatsioonil. (Knobil, 2006) Uuringud hiirtega on näidanud, et peri-implantatsioonil ekspresseeriti progesterooni mõjutusel G1 ja G2 tsükliine erinevalt - enne implantatsiooni toodeti tiinuse 3. ja 4. päeval emaka epiteelirakkudes tsükliin G1 rohkem kui G2. Implantatsiooni alguses on tsükliin G1 ekspressioon peamiselt seotud detsidualisatsioonil stroomarakkude muutumisega ning G2 on kooskõlas lõplikult välja diferentseerumise ja luminaalsete epiteelkoe apoptoosiga. (Das, 2009)

Hiirtega uuringus selgus, et mitootiline periood vastas rakutsükli G1 faasile ja detsiduaal-tundlik periood hilisemale, kui stroomarakud olid S ja G2 faasis. Arvatakse, et stroomaraku rakutsükli faas määrab detsiduaalsele stiimulile reageerimise. Algne reageerimine hormoonile võib tagada rakutsükli S või G2 faasis oleva rakupopulatsiooni, mille õige stimuleerimine võib nad suunata detsidualisatsioonini. Selliste rakkude detsiduaalreaktsioonid ergutavad ümbritsevaid rakke jätkama raku muutumise kaskaadi. (Finn jt., 1995)

Singh (2015) on kokku võtnud uurimistööd rakutsükli heterogeensust, mida mõjutab rakutsükli faas ja signaalradade võrgustik. Selgus, et kasvamise ja arenemisega seotud geenid saavutasid RNA sekveneerimisega maksimumi rakutsükli G1 faasis. Lisaks leiti, et kui rakutsükkel kontrollib heterogeensust, oleks hüpoteetiline, et rakutsükkel kontrollib ka signaalradade aktiveerimist. Tulemused näitasid, et rakk on tasakaaluolekus rakutsükli G1 faasis, mis lubab rakul reageerida muutumist indutseerivatele signaalidele. S ja G2 faasis on rakk vähem vastuvõtlik diferentseerumismärguannetele. G1 staadium oleks raku diferentseerumise indutseerimise koht pluripotentsetes tüvirakkudes. Sela jt. (2012) uuringus embrüonaalsete tüvirakkudega tuli samuti välja, et G1 faasi üksikute rakkude, mis asuvad S/G2 faasile lähemal kui G1 faasile, diferentseerumist takistati rohkem kui G1 faasile lähemal asuvad rakud. Lisaks järeldati, et S/G2 faasi rakkude diferentseerumise efektiivsus on seotud just membraani faktoritega, kuna kontaktis olevad S/G2 rakud tõkestasid täielikult oma muutumise. (Sela jt., 2012) Tuleviku uurimissuundadeks pakuti välja rakutsüklist sõltuvat uurimisviisi (Singh, 2015).

Mitootilise markeri *CCNB1* abil on võimalik uurida mRNA geeniekspressiooni rakutsükli eri faasides. Tsükliin B1 (*CCNB1*) on mitoosi kontrolliv valk, mis on reguleeritud inimesel menstruaaltsükli ajal või pärast progesterooniga mõjutust. Seda ekspresseeritakse proliferatiivse faasi ajal või hormooniga mõjutades. (Knobil, 2006) Pines ja Hunter (1991) leidsid esimestena, et *CCNB1* mRNA tase tõuseb S/G2 faasis ning on ligi kaks korda suurem kui G1 faasis. Sellise teadmise abil on võimalik *CCNB1* mRNA suhtelise geeniekspressiooniga kindlaks teha rakutsükli eri faasidesse sortimine.

2. EKSPERIMENTAALOSA

2.1. Töö eesmärgid

Antud töö hüpoteesiks oli, et hEnS rakkude hormonaalne tundlikkus detsidualiseerumisel sõltub nende rakutsükli staadiumist. Bakalaureusetöö eesmärgiks oli esiteks uurida, kas primaarseid hEnS rakke on võimalik DNA-värvimisega läbivoolutsütomeetrial rakutsükli faaside suhtes rikastada. Teiseks eesmärgiks oli välja selgitada hEnS rakkude detsidualiseerumisprotsessi dünaamika sõltuvus rakutsükli faasist, analüüsides geeniekspressiooni q-RT-PCR-ga G1 ja SG2 suhtes rikastatud rakkudes.

2.2. Materjal ja metoodika

2.2.1. Rakkude kasvatamine koekultuuris

hEnS rakke kasvatati 37°C juures inkubaatoris, milles CO₂ sisaldus oli 3%. Rakke kasvatati enne sortimist DMEM/F12 söötmes (Gibco, ThermoFisher Scientific), milles FBS (Capricorn Scientific) sisaldus oli 10% ja antibiootikumide Penicillin-Streptomycin (edaspidi AA)(Capricorn Scientific) sisaldus 1%, ning söödet vahetati umbes kaks korda nädalas või sõltuvalt rakkude kasvukiirusest. Rakke loendati hemotsütomeetria kambri abil, mille põhjal otsustati rakkude sortimise valmisolek.

Töös kasutati inimese endomeetriumi stroomarakke kahelt indiviidilt. Rakud saadi Tervisetehnoloogiate Arenduskeskuste kogutud biopsiatelt. Mõlemal indiviidil oli operatsioonile suunamise diagnoos infertiilsus ning nende vanus oli vahemikus 30-40 aastat. Indiviid, numbrikoodiga 393, on varem rasedaks jäänud ja sünnitanud, ja tema hEnS rakud eraldati menstruaaltsükli 6. päeval. Indiviidil nr 349 on kaasnev kilpnäärme haigus ning tal polnud varem rasedusi esinenud. Tema rakud eraldati tsükli 11. päeval ning operatsioonil diagnoositi *Sactosalpinx dextra*, mis põhjustab munajuhade blokeerumist. Kasutati proliferatiivse faasi rakke, mida on võimalik *in vitro* detsidualiseerida.

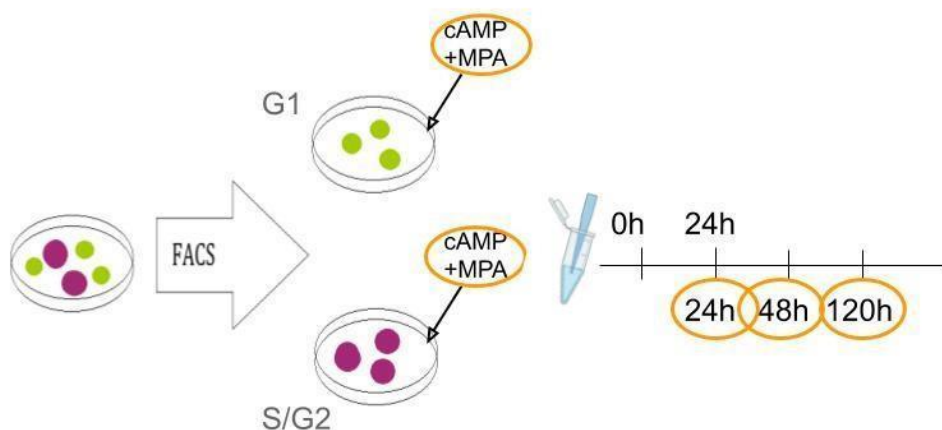
2.2.2. Läbivoolutsütomeetria

Rakkude sortimiseks eemaldati rakkudel sööde, pesti PBS-iga (ThermoFisher Scientific) ja inkubeeriti 10 min trüpsiinis (Corning). Kogutud rakud tsentrifuugiti (Eppendorf 5804R, rootoriga A-4-44) 1100 rpm juures 10 min, suspendeeriti FACS-lahuses (PBS (ThermoFisher Scientific), 2% FBS-CS ja 2% A/A) ja pressiti läbi filtri mütsi FACS-tuubi. Rakud värviti

punaselt helendava DNA värvi DRAQ5™ fluorisondiga (ThermoFisher Scientific). Rakulahusele lisati minimaalselt 5 µl DRAQ5 olenevalt rakusademe suuruselt ning inkubeeriti toatemperatuuril 30 min. Seejärel hoiti rakkudega lahust jääl, kuni rakud sorditi rakutsükli G1 ja S/G2 faasi läbivoolutsütomeetri FACS ehk rakkude fluorisorteri abil. Läbivoolutsütomeetria FACS viidi läbi Tartu Ülikooli molekulaar- ja rakubioloogia instituudis asuva BD FACSMelody™ Cell Sorter 3-laser mudeliga (BD Biosciences).

2.2.3. Detsidualiseerimine *in vitro*

FACS-iga sorditud hEnS rakud külvati koheselt 24-kannulisele koekultuuri plaadile (kasvupind 2 cm²). Rakkude tihedus igas kannus oli kuni 25 000 rakku/cm². Detsidualiseerimise indutseerimiseks *in vitro* loodi 0,5 mM 8-br-cAMP (8-bromoadenosiin-3',5'-tsükliiline adenosiinmonofosfaat) ja 1 µM MPA (6α-metüül-17α-atsetoksüprogesteroon ehk sünteetiline progestiin) sisaldav kasvukeskkond DMEM/F12 fenoolpunase vabas söötmes (milles 2% CS-FBS ja 1% A/A). Rakke inkubeeriti 37°C ja 3% CO₂ sisalduse juures vastavalt 24h, 48h ja 120h.



Joonis 4. Rakutsükli faaside G1 ja S/G2-suhtes rikastatud hEnS rakkude *in vitro* detsidualiseerimise katseskeem. hEnS rakud sorditi läbivoolutsütomeetri abil G1 ja S/G2 faasis asuvateks rakkudeks, mida mõjutati hormoonidega cAMP+MPA *in vitro* detsidualiseerumise esile kutsumiseks. Vastavatel ajapunktidel (0h, 24h, 48h, 120h) koguti cAMP+MPA indutseerimata või indutseeritud detsidualiseeritud hEnS rakud RNA eraldamiseks ja edasiseks geeniekspressiooni analüüsiks.

2.2.4. Valgusmikroskoopia

Vaadeldi eraldi indutseerimata ja indutseeritud hEnS rakkude ning ainult indutseeritud rakkude ajalist erinevust 24h, 48h ja 120h möödudes valgusmikroskoobis (Nikon Eclipse TS100). Pildid tehti Nikon Digital Sight kaameraga.

2.2.5. RNA eraldamine, cDNA süntees ja kvantitatiivne PCR

mRNA taseme kvantitatiivseks analüüsiks kasutati pöördtranskriptsiooni kvantitatiivset polümeraasi ahelreaktsiooni (RT-qPCR). Kõigepealt lüüsi detsidualiseerunud hEnS rakud Trizolis (Invitrogen, ThermoFisher Scientific) ja punktidel 0h, 24h, 48h ja 120h ning lüüsitud rakud säilitati -80°C juures, kuni RNA isoleerimiseni. RNA eraldamiseks lisati umbes 5 min toatemperatuuril hoitud proovidele 99,0-99,4% kloroformi (viiendik proovi kogusest), segati Vortexiga ja lasti umbes 2 min toatemperatuuril seista. Lahust tsentrifuugiti 12 000g juures 15 min temperatuuril 4°C. Lahusest eemaldati ülemine läbipaistev faas (umbes 60% lahusest), mis tõsteti uude 1 ml mikrotuubi. RNA-l lasti sadestuda jääkülmas isopropanoolis (suhtega 2:1) 10 min toatemperatuuril. Seejärel tsentrifuugiti proovi 12 000g juures 10 min temperatuuril 4°C. Ettevaatlikult eemaldati supernatant ja RNA jäi geelilaadseks sademesse tuubi põhjas. RNA pesti prooviga sama kogusega jääkülma 75% etanooliga ning segati sisse-välja pipeteerides ja lõpuks Vortexiga. RNA jäeti sadestuma -20°C ööpäevaks. Seejärel tsentrifuugiti proov 4°C juures 5 min ning eemaldati supernatant.

Genoomse DNA eemaldamiseks RNA proovist kasutati DNA eraldamise reagentide komplekti (ThermoFisher Scientific), mille moodustasid ensüüm *rDNaseI*, 10x *DNase I Buffer*, *DNase Inactivation Reagent* ja DNA-vaba vesi. Kõigepealt resuspendeeriti RNA 20 µl nukleaaasivabas vees. Seejärel lisati 1 µl *rDNaseI* ja 2 µl 10x *DNaseI Buffer* ning keeristati. Segu seisis 30 min 37°C juures. Järgmisena lisati 2,3 µl *DNase Inactivation r*, segati Vortexil ning lasti 2 min toatemperatuuril seista. Viimaks tsentrifuugiti lahust 10 000g juures 1,5 min ning RNA (supernatant) tõsteti uude 1 ml tuubi. RNA kontsentratsioon (ng/µl) igas proovis mõõdeti NanoDropiga (Tabel 1). Proovidest tehti 500 ng RNA sisaldusega vee lahused koguruumalaga 12 µl.

Tabel 1. Proovide RNA kontsentratsioonid. Lühend: DC: detsidualiseeritud rakud (ingl k *decidualization*); RT: rakutsükkel.

Indiviid	RT faas	Mõjutus	RNA ng/µl	RT faas	Mõjutus	RNA ng/µl
349	G1	0h	87,3	SG2	0h	51,6
349	G1	24h	82,8	SG2	24h	98,5
349	G1	24h DC	217,9	SG2	24h DC	94,5
349	G1	48h DC	62	SG2	48h DC	103,9
349	G1	120h DC	196,2	SG2	120h DC	90,9

393	G1	0h	28,8	SG2	0h	62,3
393	G1	24h	53,4	SG2	24h	35,8
393	G1	24h DC	41,4	SG2	24h DC	92,1
393	G1	48h DC	50,3	SG2	48h DC	36,5
393	G1	120h DC	45,2	SG2	120h DC	46,3

Komplementaarne DNA (cDNA) sünteesiti kõigepealt esimese reagentide komplektiga, mis sisaldas mittespetsiifilisi heksameerseid praimereid (Invitrogen, ThermoFisher Scientific), dNTP ja RNA lahust, tingimustel 65°C juures 1 min ja jääl 5 min. Teise reagentide komplektiga (ThermoFisher Scientific), mille moodustasid 5x *buffer*, DTT, *RNaseOUT™ Recombinant Ribonuclease Inhibitor* ja *SuperScript™ III Reverse Transcriptase* sünteesiti cDNA 50°C juures 60 min ja 70°C juures 15 min. cDNA hoiti -20°C juures külmkapis.

cDNA-d kasutati qRT-PCRil, mille läbi viimiseks kasutati fluorestseeruvat 5x HOT FIREPol EvaGreen qPCR Mix Plus (ROX) segu (Solis BioDyne), seitset spetsiifilist praimeripaari (Tabel 2) ning Abi 7500 Real-Time PCR masinat. Töös kasutatakse kirjanduse põhjal tuntumaid detsidualeerimismarkerid - *IGFBP-1*, *PRL*, *PRL-R*, *FOXO1* ja *HAND2*. RNA-dele tehti kahekordne lahjendus milli-Q vees ning EvaGreen segu lahjendati viiekordselt milli-Q vees, mida lisati 1 osale RNA-le 9 osa. Sama koguste suhe kehtis ka praimerite reaktsioonile. Reaktsiooni protokoll koosnes esiteks algsest denaturatsiooni etapist (95°C 15 min), teiseks 40 tsüklist 95°C juures 15 sek (denaturatsioon), 60°C juures 20 sek ja 72°C juures 40 sek. Kolmas sulamiskõvera etapp koosnes 95°C juures 15 sek, 60°C juures 15 sek ja 95°C juures 15 sek. Igale proovile tehti kolmes tehnilises korduses reaktsioon (triplikaadid).

Tabel 2. qRT-PCR-l kasutatud praimerid.

Geeni nimi	Samasuunaline (Fw) praimer	Vastassuunaline (Rev) praimer
CCNB1	TGGTGAATGGACACCAACTCT	CCAGGTGCTGCATAACTGGA
FOXO1	ACGAGTGGATGGTCAAGAGC	AATTGAATTCTTCCAGCCCGC
HAND2	CACCAGCTACATCGCCTACC	ATTTCGTTTCAGCTCCTTCTTCC
IGFBP-1	TCACAGCAGACAGTGTGAGAC	CCATTCCAAGGGTAGACGCA
PRL	CCTTCATTCCAGAAGTACCCTCA	CAGCAGGAGGGACCCTTTC

PRLR	GGTTGGTTCACGCTCCTGTA	CCCAGCAAAATGGATCTCCCA
SDHA	TGGGAACAAGAGGGCATCTG	CCACCACTGCATCAAATTCATG

2.2.6. Statistiline analüüs

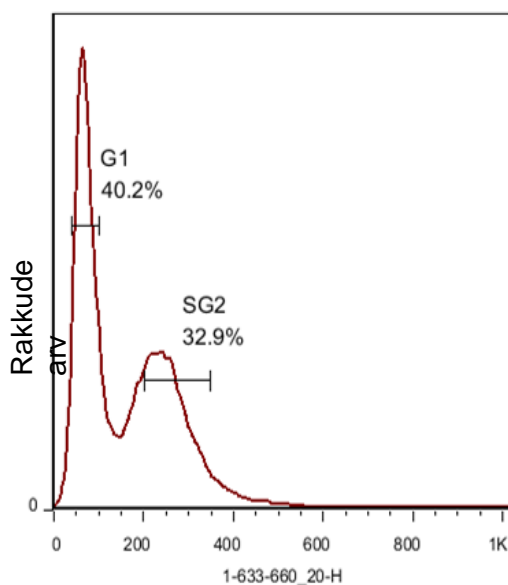
qRT-PCR-i tulemused eksporditi Livak ja Schmittgeni (2001) väljatöötatud valemitega Exceli tabelisse, kus sihtmärkgeeni suhteline ekspressioonitase arvutati $2^{-\Delta\Delta Ct}$ meetodi abil. $2^{-\Delta\Delta Ct}$ meetodi kasutamisel saadud tulemused on töös esitatud keskmiste väärtustena ja esitatud kontrollproovi suhtes. Veapiirid diagrammidel kujutavad qRT-PCR-l tekkinud kolme replikaadi varieeruvust. mRNA ekspressioon analüüsiti kaks korda samast cDNast igale indiviidi proovile. Referentsgeeniks valiti koduhoidjageen *SDHA*, mis kirjanduse põhjal andis kõige stabiilsema tulemuse, arvestades antud töö teemat (Meller jt., 2005; Woods jt., 2017). *SDHA* suhtes normaliseeritud tulemused arvutati kontrollproovi suhtes (kontroll vastab graafikul 1-le). Kontrollproovi mRNA koguti hEnS rakkudelt 24h pärast hormoonidega indutseerimata kasvusöötmesse istutamist.

2.3. Tulemused ja arutelu

2.3.1. Rakkude rikastamine G1 ja SG2 faasi suhte

Selleks, et määrata geeniekspressiooni aktiveerimine G1 ja SG2 rakutsüklifaasides, oli tarvis hEnS rakke rikastada vastavate faaside suhtes. Selleks värviti rakke DNA-värvi DRAQ5 fluorisondiga ja sorditi need voolutsütomeetria abil. Sortimist jätkati kuni mõlemas faasis olevaid rakke oli üle 250 000. FACS-sortimises esines mitmeid kordi probleeme, kus hEnS rakke ei olnud edasiseks külvamiseks piisavalt. Arvatavasti seisnes probleem selles, et DRAQ5 värv ei püsinud ühtlaselt kõikides elusrakkudes.

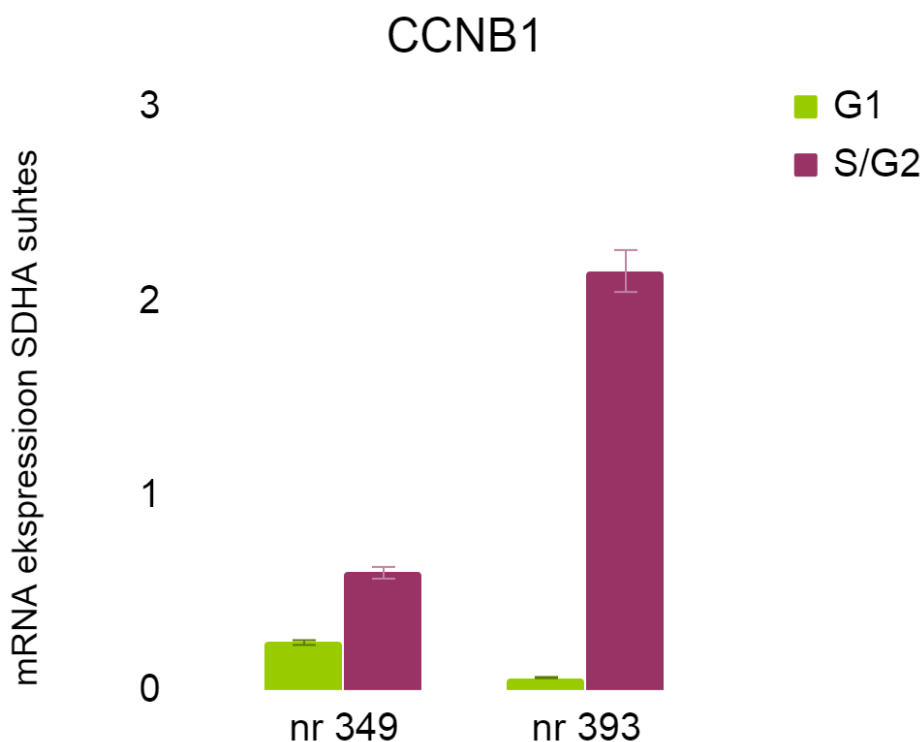
Rakkude sortimiseks valis läbivoolutsütomeetria spetsialist vahemikud, et FACS saaks DNA hulga järgi sortida rakud kahte tuubi - G1 ja S/G2 faasi. Joonisel 5 on näha hEnS rakkude DRAQ-ga värvitud DNA hulk ja hinnanguline rakutsükli profiil. G1 ja S/G2 piigid ja seatud vahemikud määrasid rikastatud populatsioonid.



Joonis 5. hEnS rakutsükli profiil DNA värvi DRAQ5 järgi. Histogrammi X-teljel on DRAQ5 DNA-värvile vastav fluorestsentsi intensiivsus ning Y-teljel on kujutatud rakkude arv. Joonisel on märgitud vahemikud, mida kasutati rakkude sortimiseks rakutsükli G1 ja S/G2 staadiumi.

2.3.2. hEnS rakkude rikastamine DNA-värviga on võimalik rakutsükli G1 ja S/G2 faasi

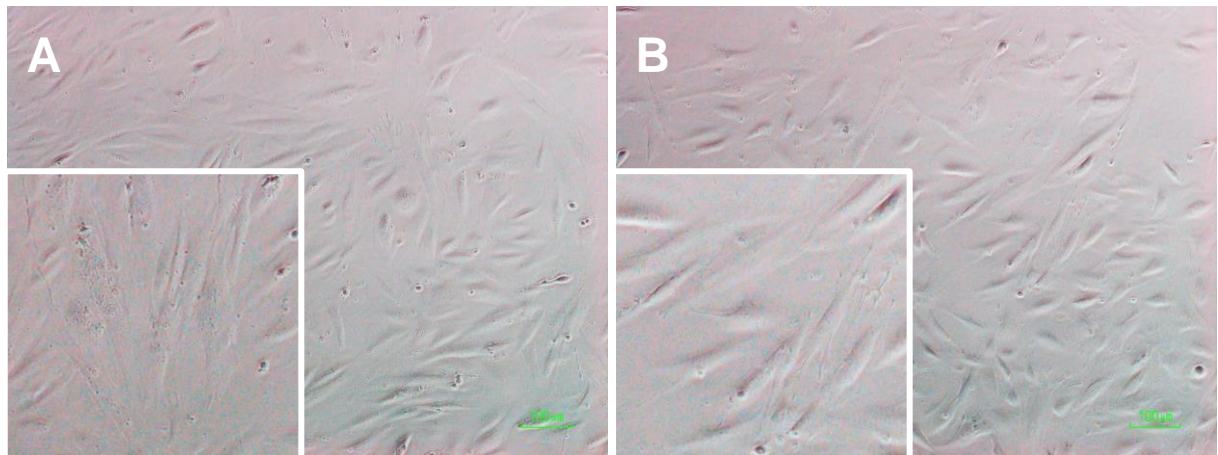
Antud uurimistöö erilisus ja vajalikkus seisneb hEnS rakkude sortimise võimalikkuses. Varasemalt pole tehtud katseid, kus primaarsetel rakkudel värvitakse DNA ning sorditakse selle abil rakutsükli eri faasidesse. Kinnitamaks, et läbivoolutsütomeetrial toimus hEnS rakkude sortimine G1 ja S/G2 faasi, eraldati rakkudest mRNA ajapunktil 0h, vahetult peale FACS-sortimist, ning uuriti vastavates proovides mitootilise markeri *CCNB1* geeniekspressiooni taset G1 ja S/G2 faasis. Selgus, et nii nr 349 kui ka nr 393 indiviidilt pärinevatest biopsiarakkudes õnnestus uuritavatesse faasidesse sortimine, kuna mitootilise markeri *CCNB1* ekspressioonitase S/G2 faasis on üle kahe korra kõrgem kui G1 faasis (Joonis 7). See tulemus on kooskõlas varasemalt avaldatuga, et B-tsükliinid ekspresseeruvad rakutsükli S/G2 faasis (Pines ja Hunter, 1991). Tulemuste põhjal saab väita, et hEnS rakkude sortimine DNA-värviga erinevatesse rakutsükli faasidesse on võimalik ning saab edasi uurida hEnS rakkudega seonduvaid muutusi detsidualiseerumisel.



Joonis 7. Mitootilise markeri *CCNB1* ekspressioon FACS-iga sorditud hEnS rakkudes. *CCNB1* mRNA ekspresseerumistaseme väärtused on näidatud koduhoidjageeni *SDHA* suhtes. Analüüsi ajapunkt: 0h. Samale cDNA proovile tehti kolm mõõtmist (n=3), mis väljenduvad joonisel veapiiride kujul

2.3.3. Detsidualiseerimise *in vitro* toimumise kindlaks tegemine detsidualiseerimismarkerite abil

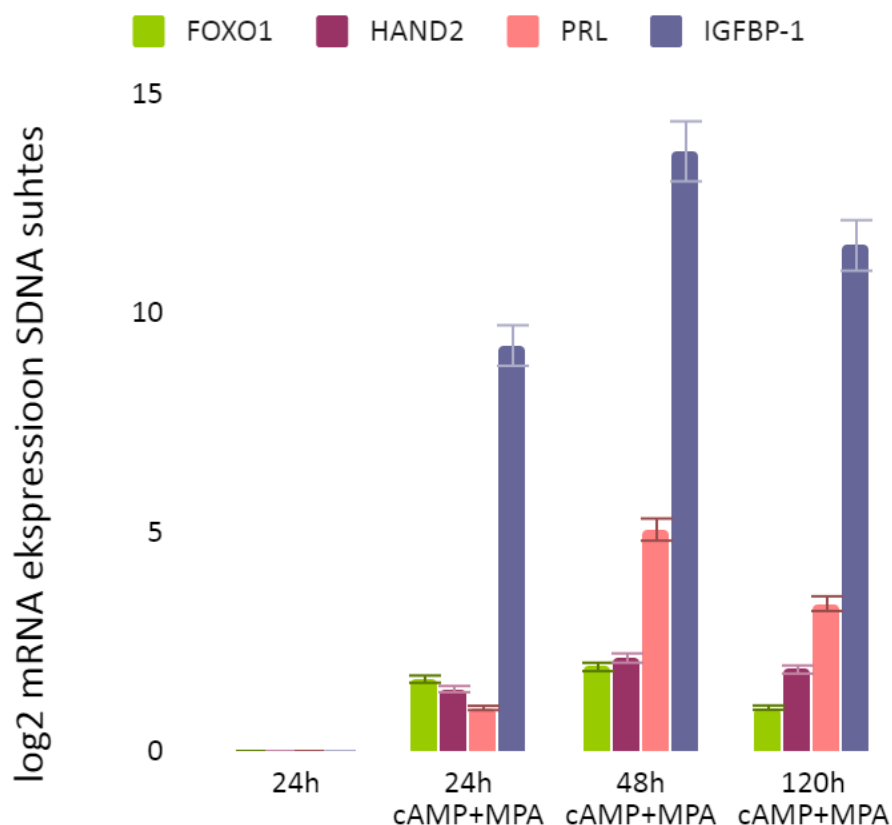
Detsidualiseerunud hEnS rakkude morfoloogiliste muutuste *in vitro* esile kutsutud detsidualiseerumise vaatlemiseks kasutati valgusmikroskoopiat. hEnS rakkude hormonaalse mõjutusega on näha, et rakud muutuvad cAMP+MPA-ga indutseerides suuremaks, piklikumaks ja polügonaalseks (hulknurkseks) (Joonis 7).



Joonis 7. Detsidualisatsioonil muutuvad inimese hEnS rakud piklikumaks ja polügonaalsemaks. Mikroskoobi pildidel on indiviidi nr 393 hEnS rakud vasakul indutseerimata ja paremal pool cAMP+MPA-ga indutseeritud 24 tunni möödudes. Külvatud rakkude arv: umbes 50 000 kannu kohta.

Kirjanduse põhjal otsustati, et hEnS rakkude hormoonidega cAMP-ga ja MPA-ga koos mõjutamine loob kunstliku detsidualiseerumise *in vitro* 1-3 päevaga. Selline indutseerimisprotokoll sobib just lühiajalisele eksperimendile nagu seda on antud uurimistöö.

Kinnitamaks töös kasutatavate detsidualiseerimismarkerite reageerimist cAMP+MPA hormoonide mõjutusele indiviidi nr 393 hEnS rakkudes, tehti kõigepealt lähteanalüüs sorteerimata rakkudega. mRNA ekspressiooni tulemused näitasid, et nii sekretoorse markeri *PRL* ja *IGFBP-1* kui ka transkriptsioonifaktorite *FOXO1* ja *HAND2* ekspressioon indutseeriti juba 24h möödudes (Joonis 8), mis on kooskõlas kirjanduse andmetega. *PRL*-i ja *IGFBP-1* ekspressioon tõusis ka hilisematel ajapunktidel, andes kinnitust, et hEnS rakud detsidualiseerusid vastusena cAMP+MPA mõjutusele.



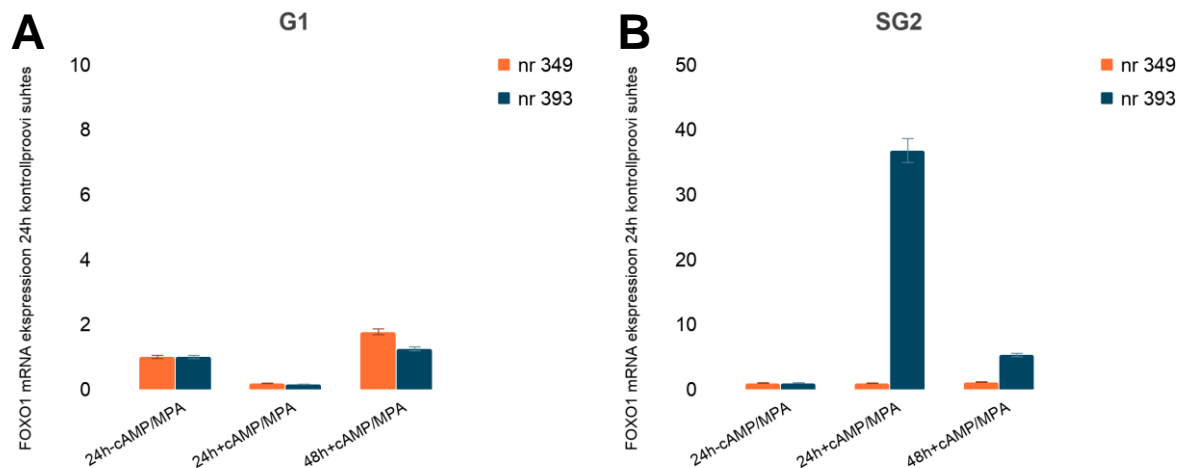
Joonis 8. Sortimata hEnS rakkude in vitro detsidualiseerumise dünaamika. Joonisel on kujutatud indiviidi nr 393 sortimata hEnS rakkude *FOXO1*, *HAND2*, *PRL* ja *IGFBP-1* mRNA ekspresseerumistasemete log2 väärtused koduhoidjageeni *SDHA* suhtes. X-teljel on RNA kogumise ajapunkt ja rakkude hormoonidega cAMP+MPA mõjutatus. Samale cDNA proovile tehti kolm mõõtmist (n=3), mis väljenduvad joonisel veapiiride kujul.

2.3.4. hEnS rakkude tundlikkus hormoonidele erineb indiviiditi S/G2 faasis

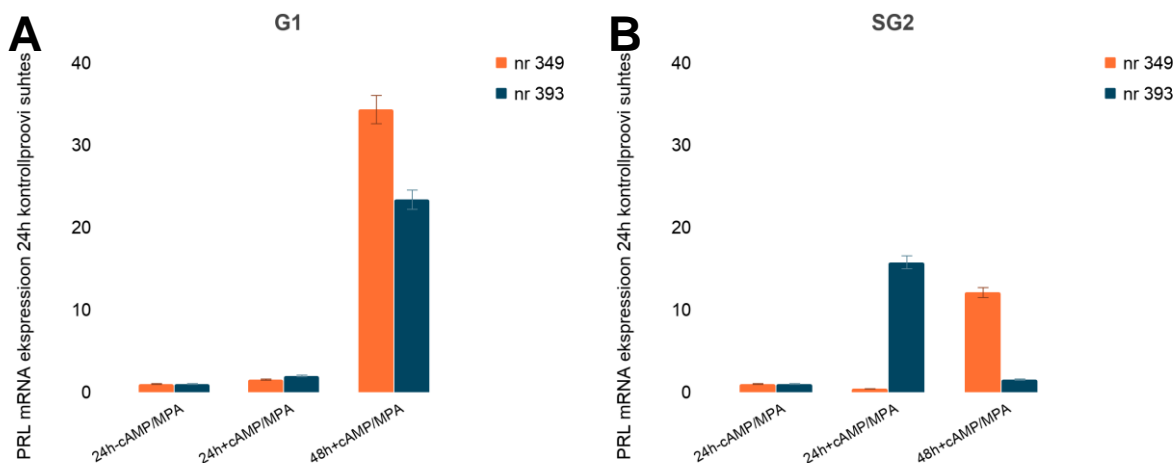
Uurimaks detsidualiseerumise dünaamika sõltuvust rakutsükli faasist, analüüsiti mRNA ekspressiooni G1 ja SG2-suhtes rikastatud populatsioonides vastusena cAMP+MPA mõjutusele, kasutades qRT-PCR-i. Tulenevalt inimese biopsia proovide haruldusest ja madalast elusrakkude sortimise saagikusest, võrreldi detsidualiseerumismarkerite mRNA ekspressioonitasemeid esialgu kahel indiviidil.

Tulemuste analüüsil selgus, et transkriptsioonifaktori *FOXO1* ekspressioon 24h ja 48h möödudes detsidualiseerumise indutseerimisest alates on mõlemal indiviidil sarnane G1-rikastatud rakkudes (Joonis 9A). Kui analüüsiti samade indiviidide SG2 rakke, siis ilmnedid erinevused (Joonis 9B). Nimelt indutseeriti nr 393 hEnS rakkudel *FOXO1* ekspressioon oluliselt tugevamini kui nr 349 rakkudel 24h ajapunktis pärast hormoonide cAMP ja MPA-ga mõjutust, kui mõjutus saadi SG2 faasis. Samasugune fenomen avaldus ka siis kui analüüsiti sekretoose markeri *PRL* mRNA

ekspressioonitasemete erinevusi nendel indiviididel (Joonis 10). G1-rikastatud rakkudes indutseeriti *PRL* ekspressioon väga tugevalt 48h ajapunktis mõlemal indiviidil (Joonis 10A). SG2-rikastatud rakkudes aga indutseeriti *PRL* ekspressioon 24h ajapunktis ainult nr 393 hEnS rakkudel ja seejärel 48h ajapunktis nr 349 hEnS rakkudel (Joonis 10B).



Joonis 9. Transkriptsioonilise markeri *FOXO1* mRNA *SDHA* suhtes normaliseeritud ja kontrollproovi suhtes arvatud ekspressioon rakutsükli faaside võrdluses. Y-teljel on kujutatud indiviidide *FOXO1* mRNA ekspresseerumistasemete väärtused 24h ajapunkti detsidualiseerimata ehk kontrolli suhtes. X-teljel on hEnS rakkude hormoonidega cAMP+MPA-ga mõjutatus ning RNA kogumise ajapunktid. **A.** *FOXO1* mRNA suhtelise geeniekspressiooni tasemed normaliseeritud *SDHA*-ga 24h kontrolli suhtes, kui hEnS rakud paiknesid G1 faasis. **B.** *FOXO1* mRNA suhtelise geeniekspressiooni tasemed normaliseeritud *SDHA*-ga 24h kontrolli suhtes, kui hEnS rakud paiknesid S/G2 faasis. Samale cDNA proovile tehti kolm mõõtmist (n=3), mis väljenduvad joonisel veapiiride kujul.



Joonis 10. Sekretoorse markeri *PRL* mRNA mRNA ekspressioon rakutsükli faaside ja indiviidide võrdluses. Joonisel on kujutatud indiviidide *PRL* mRNA ekspresseerumistasemete väärtused 24h ajapunkti detsidualiseerimata rakkude ehk kontrolli suhtes. X-teljel on hEnS rakkude hormoonidega cAMP+MPA-ga mõjutatus ning RNA kogumise ajapunktid. **A.** *PRL* mRNA suhtelised geeniekspressiooni tasemed 24h kontrolli suhtes, kui hEnS rakud paiknesid G1 faasis. **B.** *PRL* mRNA suhtelised geeniekspressiooni tasemed 24h kontrolli suhtes, kui hEnS rakud paiknesid S/G2 faasis. Samale cDNA proovile tehti kolm mõõtmist (n=3), mis väljenduvad joonisel veapiiride kujul.

Antud tulemused näitavad rakutsüklist sõltuvaid erinevusi detsidualiseerumise dünaamikas erinevatelt indiviididelt eraldatud rakkudes - markergeenid avalduvad hEnS rakkudes *in vitro* detsidualiseerumisel varieeruvalt eelkõige S/G2 faasis.

Nende tulemuste analüüsil tuleb arvesse võtta ka indiviide eripärasid. Indiviidi nr 349 biopsia eemaldamise käigus esines *Sactosalpinx dextra* seisund – munajuha on blokeeritud, mille üks põhilistest sümptomitest on viljatus. Selline seisund võib tekitada häired normaalses detsidualiseerimisprotsessis ning see ei käitu terve inimese endomeetriumile omaselt. Piiratud ressursid indiviididelt eraldatud biopsiatega ei anna täpsema järelduse tegemiseks piisavalt andmeid. Tulevikus tuleks kaasata rohkem indiviide, kuna primaarsed rakud ei anna tihti üheseid tulemusi.

Indiviidil nr 393 on varasemalt rasedus tekkinud ja ta on varasemalt edukalt sünnitanud ning endomeetriumiga seonduvaid haigusi operatsioonil ei esinenud. Seega võib indiviidi nr 393 transkriptsiooniliste (*FOXO1*) ja sekretoorsete (*PRL*) detsidualiseerimismarkerite põhjal järeldada, et hEnS rakud reageerivad *in vitro* detsidualiseerumisel rakutsükli G1 ja S/G2 faasis kasvukeskonda lisatud hormoonidele cAMP ja MPA erinevalt.

Lisaks oleks huvitav välja selgitada, kas rakutsükli faasi sõltuvus detsidualisatsioonil sõltub hEnS rakkude omavahelistest signaalidest membraanil, kas üksikult detsidualiseeruma suunatud hEnS rakud mitootilise tsükli S/G2 faasis naaberrakkude olemasoluta takistavad diferentseerumise protsessi täielikult.

Samuti tuleks lähemalt uurida, kuidas sõltub hEnS rakkude rakutsüklist-sõltuv detsidualiseerumine indiviidide tervisest. Antud töö tulemused annavad oletada, et terve ja mitte-retseptiivse endomeetriumiga hEnS rakkude diferentseerumise dünaamika annab ka suuresti erineva tulemuse. Tööga kinnitati, et primaarseid rakke saab DNA-värvimisega FACS-il sortida, mis võimaldab tulevikus rohkem indiviide analüüsida.

KOKKUVÕTE

Endomeetriumi detsidualiseerumine on võtmeprotsess naisel raseduse saavutamiseks. Häired rakkude detsidualiseerumisel võivad põhjustada naisel viljatust, mistõttu on oluline mõista selle protsessiga seonduvaid mehhanisme. Kirjanduse põhjal püstitati hüpotees, et hEnS rakkude vastus kasvukeskkonnast tulenevatele signaalidele sõltub nende rakutsükli faasis paiknemisest. Antud bakalaureusetöö põhieesmärk oli välja selgitada detsidualiseerimisprotsessi dünaamika sõltuvus rakutsükli staadiumist.

Bakalaureusetöö on oma tulemuste osas olulise tähtsusega, kuna varasemalt pole inimese endomeetriumi stroomarakke rikastatud DNA-värviga. Töö tulemused kinnitavad hEnS rakkude sortimise võimalikkust rakutsükli G1 ja S/G2 faasi DNA-värvi DRAQ5-ga läbivoolutsütomeetrial. Katse tulemuste põhjal selgus, et hEnS rakud reageerisid rakutsükli G1 ja S/G2 faasis hormonaalsele mõjutusele (cAMP+MPA) erinevalt indiviidides nr 349 ja nr 393. Suurem erinevus esines *FOXO1* ja *PRL* ekspressioonil S/G2 faasis 24 tunni möödudes peale cAMP ja MPA indutseerimist. Uurimustöö tulemused kinnitavad hüpoteesi ehk detsidualiseerumise dünaamika on sõltuv hEnS rakkude rakutsükli staadiumist.

Käesolev töö on tehtud kahest indiviidist pärit rakkudega. Täpsemate tulemuste saavutamiseks tuleks eksperimenti korrata rohkemate indiviididega, et kinnitada tulemuste varieeruvust indiviidide vahel. Lisaks annaks tervete ja endomeetriumi normaalset talitust häiriva haigusega inimeste vaheline uurimine rohkem informatsiooni, kuidas viljatusega seonduvad probleemid on seotud rakutsükli poolt reguleeritud individuaalse varieeruvusega detsidualiseerumisel. Samuti tuleks täiendada sortimise metoodikat, et sorditud rakud jõuaksid kiiremini detsidualiseerumist indutseerivasse keskkonda *in vitro*, et vältida sorditud rakkude võimalikku stressi.

Cell cycle-modulation of human endometrium stromal cells during decidualization

Karoliina Kangur

Summary

Human endometrial stromal cells (hEnS cells) undergoes cyclic morphological and functional changes in endometrium during secretory phase of menstrual cycle that is called decidualization. Decidualization process is maintenance for pregnancy. Many women suffer from infertility that is caused by decidualization process disorders. Decidualization can be establish *in vitro* in 2-3 days under hormonal inducing. Proliferative cells are driven to secretory decidual cells by rising levels of steroid hormones progesterone and cAMP production. Typically stem cells are more responsive to signals that drives them to differentiation in G1 phase of cell cycle than in S/G2. Understanding the mechanism for decidualization process can accomplish the maintenance of healthy pregnancy.

This study's importance consist in enriching cell cycle phases in the hEnS cells. Result show that hEnS cells staining with DNA fluorescent probe solution DRAQ5 allow flow cytometry sorting to G1 and S/G2 phase of the cell cycle. Mainly, result from this study shows that during the induced decidualization *in vitro* hEnS cells respond to decidual markers, like *FOXO1* and *PRL*, more differently in S/G2 phase of the cell cycle than in G1 phase. In future, there needs to be more individuals to compare the results with stem cells variable nature. Also, to better understanding the decidualization process mechanisms the experiment needs to contain both healthy and non-receptive endometrium individual. For example, this study shows differences in both individual's results for learning the cell cycle decidualization dynamics. In addition, there needs to develop better methods to achieve decidualization *in vitro* right after cell enriching with DNA stain in order that the sorted cells wouldn't be under any stress.

TÄNUSÕNAD

Täna oma juhendajaid Kersti Jäägerit ja Tambet Tõnissood panustatud aja ja kannatlikkuse, jagatud nõuannete ning toetava suhtumise eest. Olen tänulik Dmitri Lubenetsile, kes läbivoolutsütomeetrilised analüüsid võimalikuks tegi, ja Külli Samuelile, kes jagas näpunäiteid rakkude hoolitsemise eest. Veel soovin tänada Andres Salumetsa, kes töö võimalikuks tegi Tervisetehnoloogiate Arenduskeskuses. Täna ka oma perekonda, kes sellel teekonnal mulle toeks olid.

Achache, H. ja Revel, A. (2006). Endometrial receptivity markers, the journey to successful embryo implantation. *Human Reproduction Update*, Volume 12, Issue 6, November/December 2006, Pages 731–746.

Bole-Feysot, C., Goffin, V., Edery, M., Binart, N. ja Kelly, P. A. (1998). Prolactin (PRL) and Its Receptor: Actions, Signal Transduction Pathways and Phenotypes Observed in PRL Receptor Knockout Mice. *Endocrine Reviews*, Volume 19, Issue 3, 1 June 1998, Pages 225–268.

Cho, H., Okada, H., Tsuzuki, T., Nishigaki, A., Yasuda, K. ja Kanzaki, H. (2013). Progesterin-induced heart and neural crest derivatives expressed transcript 2 is associated with fibulin-1 expression in human endometrial stromal cells. *Fertility and Sterility*, Volume 99, Issue 1, Pages 248-255.E2.

Das, Sanjoy K. (2009). Cell cycle regulatory control for uterine stromal cell decidualization in implantation. *Reproduction*, Volume 137, Issue 6, Pages 889–899.

Finn, C. A., Pope, M. ja S. R. Milligan, S. R. (1995) Control of uterine stromal mitosis in relation to uterine sensitivity and decidualization in mice. *Journal of Reproduction and Fertility* (1995) 103, 153-158.

Fowler, D. J., Nicolaides, K. H., Miell, J. P. (2000). Insulin-like growth factor binding protein-1 (IGFBP-1): a multifunctional role in the human female reproductive tract. *Human Reproduction Update*, 2000, Vol. 6, No. 5 pp. 495-504.

Freeman, M. E., Kanyicska, B., Lerant, A., Nagy, G. (2000). Prolactin: Structure, Function, and Regulation of Secretion. *Physiological Reviews*, Volume 80, Issue 4, January 2000, pages 1523-1631.

Ganeff, C., Chatel, G., Munaut, C., Frankenne, F., Foidart, J.-M. ja Winkler R. (2008). The IGF system in in-vitro human decidualization. *Molecular Human Reproduction*, Volume 15, Issue 1, Pages 27–38.

Garzia, E., Borgato, S., Cozzi, V., Doi, P., Bulfamante, G., Persani, L. ja Cetin, I. (2004). Lack of expression of endometrial prolactin in early implantation failure: a pilot study. *Human Reproduction*, Volume 19, Issue 8, August 2004, Pages 1911–1916.

Gellersen, B. ja .Brosens, J. J. (2014). Cyclic Decidualization of the Human Endometrium in Reproductive Health and Failure. *Endocrine Reviews*, Volume 35, Issue 6, p 851-905.

- Hawkins, S. M. ja Matzuk, M. M. (2010). Menstrual Cycle: Basic Biology. *Annals of the New York Academy of Sciences*, Volume 1135, Issue 1, Pages 10-18.
- Irwin, J. C., Kirk, D., Quigley, M. M., Gwatkin, R. B. L. ja King, R. J. B. (1989). Hormonal regulation of human endometrial stromal cells in culture: an in vitro model for decidualization. *Fertility and Sterility*, November 1989, Volume 52, No. 5, Pages 761-768.
- Julkunen, M., Koistinen, R., Suikkari, A.-M., Seppälä, M., ja Jänne, O. A. (1990). Identification by Hybridization Histochemistry of Human Endometrial Cells Expressing mRNAs Encoding a Uterine β -Lactoglobulin Homologue and Insulin-Like Growth Factor-Binding Protein-1. *Molecular Endocrinology*, Volume 4, No. 5, Pages 700-707.
- Kim, J. J., Jaffe, R. C. ja Fazleabas, A. T. (1998). Comparative Studies on the In Vitro Decidualization Process in the Baboon (*Papio anubis*) and Human. *Biology of Reproduction*, Volume 59, Issue 1, Pages 160–168.
- Knobil, E. 2006. Implantation. Pages 169-175. Neill, J. D. (ed.), *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction*, Third Edition, Volume 1, Chapter 4. Gulf Professional Publishing, 2006.
- Knobil, E. 2014. Embryo Implantation. Page 1716. Plant, T. M., Zeleznik, A. J. (ed.), *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction*, Fourth Edition, Volume 2, Chapter VI. Academic Press, 2014.
- Labied, S., Kajihara, T., Madureira, P. A. ... Brosens, J. J. (2006). Progestins Regulate the Expression and Activity of the Forkhead Transcription Factor FOXO1 in Differentiating Human Endometrium. *Molecular Endocrinology*, Volume 20, Issue 1, Pages 35–44.
- Lessey, B. A. ja Young, S. L. (2019). What exactly is endometrial receptivity? *Fertility and Sterility*, April 2019, Volume 111, Issue 4, Pages 611–617.
- Livak, K. J. ja Schmittgen, T. D. (2011). Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method. *Methods*, Volume 25, Issue 4, Pages 402-408.
- Matsumoto, H., Sakai, K., Iwashita, M. (2008). Insulin-like growth factor binding protein-1 induces decidualization of human endometrial stromal cells via $\alpha 5\beta 1$ integrin. *Molecular Human Reproduction*, Volume 14, Issue 8, Pages 485-489.
- Meller, M., Vadachkoria, S., Luthy, D. A. ja Williams M. A. (2005). Evaluation of Housekeeping Genes in Placental Comparative Expression Studies. *Placenta*, 26, 601–607.

Miftahof, R. N. ja Nam, H. G. 2011. The Uterus. Pages 2-3. Biomechanics of the Gravid Human Uterus, Chapter 1. Springer Science & Business Media, London New York 2011.

Okada, H., Tsuzuki, T. and Murata, H. (2018). Decidualization of the human endometrium. *Reproductive Medicine & Biology*, Jul2018, Vol. 17 Issue 3, p220-227, 8p.

Saleh, L., Otti, G. R., Fiala, C., Pollheimer, J. ja Knöfler, M. (2011). Evaluation of human first trimester decidual and telomerase-transformed endometrial stromal cells as model systems of in vitro decidualization. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 2011 Dec 7, Volume 9:155.

Samalecos, A., Reimann, K., Wittmann, S., Schulte, H. M., Brosens, J. J., Bamberger, A.-M. ja Gellersen, B. (2009). Characterization of a novel telomerase-immortalized human endometrial stromal cell line, St-T1b. *Reproductive Biology and Endocrinology*, *Reprod Biol Endocrinol*: 2009; 7: 76.

Sela, Y., Molotski, N., Golan, S., Itskovitz- Eldor, J. ja Soen, Y. (2012). Human Embryonic Stem Cells Exhibit Increased Propensity to Differentiate During the G1 Phase Prior to Phosphorylation of Retinoblastoma Protein. *Stem Cells Journals*, Volume 30, Issue 6, Pages 1097-1108.

Singh, A. M. (2015). Cell Cycle-Driven Heterogeneity: On the Road to Demystifying the Transitions between “Poised” and “Restricted” Pluripotent Cell States. *Stem Cells International*, Volume 2015: April.

Singh, A. M., Chappell, J., Trost, R. ... Dalton, S. (2013). Cell-Cycle Control of Developmentally Regulated Transcription Factors Accounts for Heterogeneity in Human Pluripotent Cells. *Stem Cells Reports*, Volume 1, Issue 6, Pages 532-544.

Singh, M., Chaudhry, P. ja Asselin, E. (2011). Bridging endometrial receptivity and implantation: network of hormones, cytokines, and growth factors. *Journal of Endocrinology*, Volume 210, Issue 1, Pages 5-14.

Strowitzki, T., A. Popovici, G. R. ja Wolff, M. (2006). The human endometrium as a fertility-determining factor. *Human Reproduction Update*, Volume 12, Issue 5, September/October 2006, Pages 617–630.

Takano, M., Lu, Z., Goto, T. ... Julie Kim, J. J. (2007). Transcriptional Cross Talk between the Forkhead Transcription Factor Forkhead Box O1A and the Progesterone Receptor Coordinates

Cell Cycle Regulation and Differentiation in Human Endometrial Stromal Cells. *Molecular Endocrinology*, Volume 21, Issue 10, 1 October 2007, Pages 2334–2349.

Teklenburg, G., Salker, M., Molokhia, M. ... Macklon, N. S. (2010). Natural Selection of Human Embryos: Decidualizing Endometrial Stromal Cells Serve as Sensors of Embryo Quality upon Implantation. *Plos One Journal article*.

Pines, J. Ja Hunter, T. (1991). Human Cyclins A and B1 Are Differentially Located in the Cell and Undergo Cell Cycle-Dependent Nuclear Transport. *The Journal of Cell Biology*, October 1991, Volume 115, Number 1, Pages 1-17.

Whitfield, M. L., Sherlock, G., Saldanha, A. J., ... Botstein, D. (2002). Identification of Genes Periodically Expressed in the Human Cell Cycle and Their Expression in Tumors. *Molecular Biology of the Cell*, 2002 Jun; 13(6): 1977–2000.

Woods, L., Perez-Garcia, V., Kieckbusch, J., Wang, X., DeMayo, F., Colucci, F. ja Hemberger, M. (2017). Decidualisation and placentation defects are a major cause of age-related reproductive decline. *Nature Communications*, Volume 8, Article number: 352.

KASUTATUD VEEBIAADRESSID

Ajakirjade nimetuste ametlikud lühendid: <https://home.ncifcrf.gov/research/bja/>

Artiklite otsingumootor: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

Eesti Biokeemia Seltsi sõnastik: <http://www.biokeemiaselts.ee/?mid=9&lang=et>

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, Karoliina Kangur (sünnikuupäev: 22.01.1997)

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) minu loodud teose
„Inimese endomeetriumi stroomarakkude rakutsükli faasist-sõltuv detsidualiseerumise dünaamika“, mille juhendajad on Kersti Jääger ja Tambet Tõnissoo,
 - 1.1. reprodutseerimiseks eesmärgiga seda säilitada, sealhulgas lisada digitaalarhiivi DSpace kuni autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni.
 - 1.2. annan Tartu Ülikoolile loa teha punktis 1 nimetatud teos üldsusele kättesaadavaks Tartu Ülikooli veebikeskkonna, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace kaudu Creative Commons'i litsentsiga CC BY NC ND 3.0, mis lubab autorile viidates teost reprodutseerida, levitada ja üldsusele suunata ning keelab luua tuletatud teost ja kasutada teost ärieesmärgil, kuni autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni.
2. olen teadlik, et punktides 1 ja 2 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.
3. kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei riku ma teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse õigusaktidest tulenevaid õigusi.

Karoliina Kangur

10.08.2020